云 南 植 物 研 究 2007，29 (4)：388～392
Acta Botanica Yunnanica

多叶重楼遗传多样性的 ISSR 分析[*]

何 俊[1,2]，杨柏云[1]，陈少风[1]，高连明[2]，王 红[2**]

(1 南昌大学生命科学学院，江西 南昌 330047；2 中国科学院昆明植物研究所
生物多样性与生物地理学重点实验室，云南 昆明 650204)

摘要：采用 ISSR 分子标记对多叶重楼种下 3 个变种的 8 个居群共 208 份样品的遗传多样性进行了分析。14 条引物共检测到 251 个清晰的扩增位点，其中多态位点 235 个。在物种水平上，多态位点百分率（PPB）达 93.63%，Nei's 基因多样性指数（H_E）为 0.2204、Shannon's 信息指数（H_O）为 0.3532。在居群水平上，多态位点百分率（PPB）为 50.45%，Nei's 基因多样性指数（H_E）为 0.1405，Shannon's 信息指数（H_O）为 0.2194，这些均表明多叶重楼的遗传多样性水平较高。此外，还用 NTSYS 软件对样品进行了 UPGMA 聚类分析，结果显示滇重楼的 6 个居群聚为一支，滇重楼与狭叶重楼有较近的亲缘关系，而与长药隔重楼之间的遗传分化较大。本研究提出了合理保护重楼植物资源的若干措施，为进一步开展滇重楼优质种质引种驯化，实现种质资源多样性的合理保护和可持续利用提供参考。

关键词：多叶重楼；ISSR；遗传多样性

中图分类号：Q 943，Q 949　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2007) 04-388-05

Assessment of Genetic Diversity of *Paris polyphylla* (Trilliaceae) by ISSR Markers

HE Jun[1,2]，YANG Bai-Yun[1]，CHEN Shao-Feng[1]，GAO Lian-Ming[2]，WANG Hong[2**]

(1 *Colleage of Life Science*，*Nanchang university*，Nanchang 330047，China；2 *Laboratory of biodiversity and biogeography*，
Kunming Institute of Botany，*Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China)

Abstract : Some species of the genus *Paris* are of high medicinal value . Severe human activities particularly over-harvesting have led to recent declines of their population size and fragmented habitat patches . Inter-simple sequence repeat markers (ISSR) were applied to investigate the genetic diversity of eight populations of *Paris polyphylla* in Yunnan and Sichuan Provinces . Fourteen primers resulted to a total of 251 bands from the eight populations，of which 235 were polymorphic，which showes a high level of genetic diversity in this species . A relatively high level of genetic diversity was revealed：PPB = 93.63%，$H_E = 0.2204$ and $H_O = 0.3532$ at the species level；PPB = 50.45%，$H_E = 0.1405$ and $H_O = 0.2194$ at the population level . The $G_{ST} = 0.3625$ indicated a high degree of genetic differentiation among populations . Genetic variation occurred mainly within populations . In UPGMA cluster analysis the six populations of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were divided into two clades，and *P. polyphylla* var. *yunnanensis* is more related to *P. polyphylla* var. *stenophylla* than to *P. polyphylla* var. *pseudothibetica* . In this paper，some conservation concerns were discussed which would be helpful for the conservation and sustainable utilization of this medicine resources .

Key words: *Paris polyphylla*；ISSR；Genetic diversity

---

[*] 基金项目：云南省天然药物化学重点实验室开放基金项目和国家自然科学基金（30670160）资助

[**] 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：wanghong@mail.kib.ac.cn

收稿日期：2006-10-09，2007-03-13 接受发表

作者简介：何俊（1982-）男，硕士研究生，主要从事植物系统与进化和植物资源研究。

多叶重楼（*Paris polyphylla* Smith）为延龄草科（Trilliaceae）重楼属（*Paris* L.）侧膜亚属（subgen. *Daiswa*（Raf.）H. Li）蚤休组（sect. *Euthyra* Franch.）植物，下分 8 个变种和 2 个变型（李恒，1998）。多叶重楼是侧膜亚属中分布最广，外部形态多样化程度最高的物种。此外，多叶重楼种内植物的染色体主要以二倍体为主，兼有四倍体。作为多叶重楼种下变种的滇重楼（*P. polyphylla* var. *yunnanensis* Hand.-Mazz.），不同居群的核型也有所不同，而狭叶重楼（*P. polyphylla* var. *stenophylla* Franch.）是多叶重楼中分布最广，生态幅度最大的一个变种（李恒，1998）。由于其化学成分复杂，药理活性强，临床应用范围广，其根茎长期以来就被作为多种中成药和新药的主要原材料（张金渝等，2004）。然而，由于人为过度地采挖，目前重楼野生资源已遭到不同程度的破坏，生境片段化较为严重。一些学者利用 RAPD 分子标记对重楼属植物遗传多样性进行了研究（唐荣华等，2003；张金渝等，2004）。本文利用 ISSR 分子标记分析了多叶重楼 3 个变种 8 个居群的遗传多样性水平和遗传结构，将对进一步保护和合理利用重楼属植物提供理论指导。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验材料来自 8 个居群，除 HL 居群取自四川外，其余各居群均来自云南境内。其中滇重楼有 6 个居群，狭叶重楼和长药隔重楼（*P. polyphylla* var. *pseudothibetica* H. Li）各 1 个居群。各居群的取样位置和采样个体数分别见图 1 和表 1。新鲜叶片用硅胶干燥后于 4℃储存备用。

1.2　DNA 的提取与 PCR 的扩增

采用改良的 CTAB 法（Doyle，1991）提取总 DNA。用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 下的光密度值（OD 值），然后根据 Ausubel 等（1995）的方法确定总 DNA 的浓度和质量，将样品浓度稀释至 50 ng μL 用于 PCR 反应。

PCR 反应体系（25 μL）：ddH_2O 16.5 μL，10× PCR buffer（Mg^{2+} Plus）2.5 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）1.8 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）1.2 μL，Formamide 0.5 μL，Tag 酶（5 u/μL）0.2 μL，引物（10 μmol/L）1.3 μL，模板 DNA（50 ng/μL）1.0 μL。扩增程序：95℃预变性 5 min，1 循环；94℃变性 40 s，52℃退火 45 s，72℃延伸 90 s。40 循环；循环结束后 72℃延伸 7 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳用 GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder plus 作为分子量对照，EB 染色，1×TBE 缓冲液和 4 V cm 电压电泳分离，用 BIO-RAD 公司 2000 型凝胶电泳图象分析系统照相。

1.3　数据统计与分析

对 ISSR 电泳凝胶图进行人工读带，同一引物扩增产物按电泳中迁移率一致的条带被认为具有同源性，按相同迁移位上扩增阳性记为 1 和扩增阴性记为 0 的格式产生二态数据矩阵，输入计算机得到 ISSR 表型数据矩阵。采用 POPGENE1.31 软件（Yeh 等，1997）计算各居群的

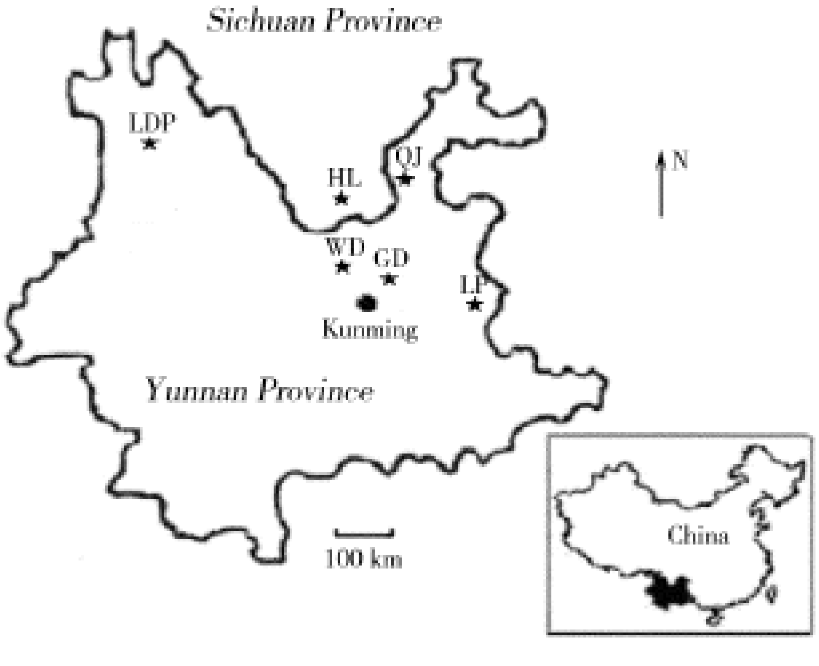

图 1　取样分布图（居群代号同表 1）

Fig. 1　Map showing locations of the sampled populations

表 1　各居群的样品来源

Table 1　Source of each population of *Paris* in this study

物种 Species	居群代号 Population No.	分布地 Population locality	采样数 Sample number	海拔 Altitude (m)
P. polyphylla var. *yunnanensis*	HL	四川会理	24	1800
P. polyphylla var. *yunnanensis*	LP	云南罗平	24	1800
P. polyphylla var. *yunnanensis*	GD	昆明果东	27	2000
P. polyphylla var. *yunnanensis*	DX	栽培于武定（引种自丽江）	28	2550
P. polyphylla var. *yunnanensis*	DZ2	栽培于武定（引种自武定）	25	2550
P. polyphylla var. *yunnanensis*	DZ4	栽培于武定（引种自大理）	25	2550
P. polyphylla var. *stenophylla*	QJ	云南巧家药山	29	2660
P. polyphylla var. *pseudothibetica*	LDP	云南维西	26	2600

多态位点百分率（PPB）、Nei's（Nei，1973）基因多样性（H_E）、Shannon's 指数（H_O）（H_O = - Σpi log2 pi，pi 为居群中第 i 个等位基因的频率）（Lewontin，1972）、等位基因数（Na）、有效等位基因数（Ne）、基因分化系数（G_{ST}）、基因流（N_m）（Slatkin and Borton，1989）；同时分别根据 Shannon's 指数（H_O）在物种水平的基因多样性（H_{sp}）和居群水平的基因多样性（H_{pop}），利用（（H_{sp}-H_{pop}）/ H_{sp}）来估测居群间的遗传变异。用 WINAMOVA 1.55（Excoffier 等，1992）软件分析遗传变异在居群间与居群内的分布，居群间的遗传分化；用 NTSYSpc 2.1（Rohlf，2000）计算个体间的 Nei 相似性系数（Nei and Li，1979），并对个体进行聚类分析。

2　实验结果

2.1　遗传多样性

从 100 条引物中筛选出 14 条扩增产物条带清晰、稳定性和重复性好的引物用于 8 个居群共 208 份样品的 PCR 扩增（表 2）。每个引物产生 13～22 条，长度在 380～2 000 bp 之间。14 条引物共检测到 251 个位点，其中多态位点 235 个。在物种水平上，多态位点百分率（PPB）达 93.63%，Nei's 基因多样性指数（H_E）为 0.2204、Shannon's 信息指数（H_O）为 0.3532；在居群水平上，多态位点百分率（PPB）为 50.45%，Nei's 基因多样性指数（H_E）为 0.1405，Shannon's 信息指数（H_O）为 0.2194（表 3）。

2.2　居群遗传变异分析

POPGENE 的分析结果表明，多叶重楼各居群间存在较大的遗传分化，居群间遗传分化系数（G_{ST}）仅为 0.3625，表明居群间的遗传变异占总的遗传变异的 36.25%，遗传变异主要存在于居群内。而根据遗传多样性水平在物种水平的基因多样性（H_{sp}）和居群水平的基因多样性（H_{pop}）的分化，各居群间的 Shannon's 居群分化系数（（H_{sp}-H_{pop}）/ H_{sp}）= 0.3788，说明有 37.88% 的遗传变异存在于居群间。用 WINAMOVA 1.55 软件对遗传变异在居群间与居群内的分布进行分析的结果显示，居群间的遗传变异占 41.43%（$P < 0.0002$），居群内的遗传变异占 58.57%（表 4）。这 3 种方法计算的结果相似，均表明多叶重楼各居群之间有较高的遗传分化，但遗传变异主要存在于居群内。居群间基因流（N_m）为 0.8792，表明居群间基因交流较大。

表 2　筛选到的 14 个 ISSR 引物序列

Table 2　List of 14 ISSR primers and their sequences

引物 Primer	序列 Sequence5'-3'	引物 Primer	序列 Sequence5'-3'
ISSR 1	VHVG $(TG)_7$	UBC 818	$(CA)_8G$
ISSR 2	BDB $(TCC)_5$	UBC 825	$(AC)_8T$
ISSR 3	HVH $(TCC)_5$	UBC 826	$(AC)_8C$
ISSR 4	HVH $(CA)_7T$	UBC 827	$(AC)_8G$
ISSR 8	GGA $(GTG)_4$	UBC 840	$(GA)_8RG$
ISSR 9	CCC $(GT)_6$	UBC 855	$(AC)_8YT$
UBC 813	$(CT)_8T$	UBC 866	$(CTC)_5$

表 3　8 个居群的遗传多样性（括号中的值为标准差）

Table 3　Genetic variation of the 8 populations of *P. polyphylla* (Standard deviations in parenthesis)

居群 Population	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Nei's 基因多样性 H_E	Shannon's 指数 H_O	多态位点百分率 PPB (%)
LP	1.5378 (0.4996)	1.2551 (0.3327)	0.1556 (0.1829)	0.2403 (0.2641)	53.78
GD	1.5976 (0.4914)	1.2429 (0.2971)	0.1563 (0.1672)	0.2486 (0.2447)	59.76
HL	1.4661 (0.4998)	1.2134 (0.2774)	0.1398 (0.1830)	0.2145 (0.2645)	46.61
DX	1.5697 (0.4961)	1.2408 (0.3076)	0.1522 (0.1721)	0.2398 (0.2513)	56.97
DZ2	1.5418 (0.4992)	1.2330 (0.3366)	0.1398 (0.1613)	0.2234 (0.2404)	54.18
DZ4	1.6056 (0.4897)	1.2676 (0.3234)	0.1668 (0.1774)	0.2609 (0.2563)	60.56
QJ	1.4223 (0.4949)	1.1961 (0.3138)	0.1194 (0.1726)	0.1852 (0.2512)	42.23
LDP	1.2948 (0.4569)	1.1569 (0.2948)	0.0939 (0.1659)	0.1424 (0.2425)	29.48
居群水平 Average	1.5044 (0.4910)	1.2257 (0.3104)	0.1405 (0.1728)	0.2194 (0.2519)	50.45
物种水平 Taxa	1.9363 (0.2448)	1.3395 (0.2914)	0.2204 (0.1551)	0.3532 (0.2123)	93.63

表 4　居群间与居群内的遗传变异

Table 4　Analysis of molecular variance (AMOVA) among/within *P. polyphylla*

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean squares	Variance component	% of total variance	P-Value
Among populations	7	2965.63	423.66	15.46	41.43	< 0.0002
Within population	200	4372.03	21.86	21.86	58.57	< 0.0002

2.3　聚类分析

利用 NTSYSpc 2.1 软件根据个体间的遗传距离（Nei and Li，1979）对多叶重楼各居群进行 UPGMA 聚类分析（图 2）。滇重楼 6 个居群先聚在一起，再与 QJ 居群聚为一大支，而 LDP 居群与其他居群之间有较大分化，但各居群的所有个体都各自聚在一起。

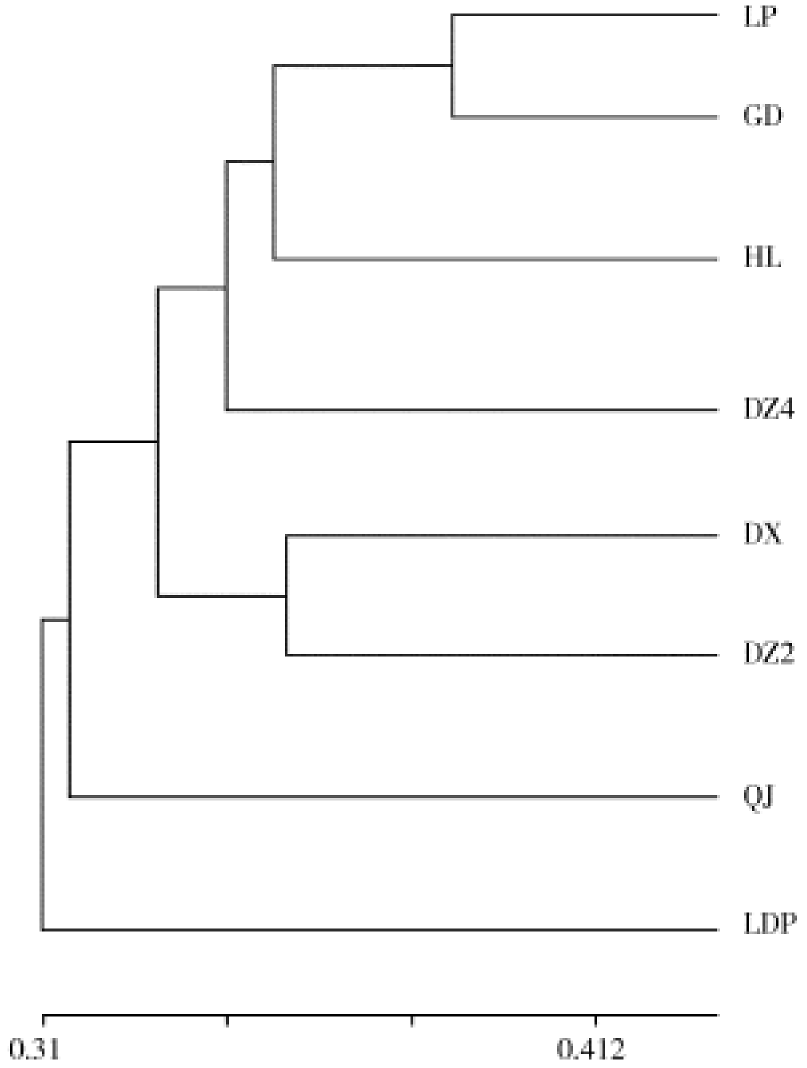

图 2　8 个居群的（Nei & Li）相似性系数 UPGMA 聚类图（居群代号同表 1）

Fig. 2　UPGMA dendrogram of the populations of *P. polyphylla* based on Nei & Li coefficient (Population codes are given in Table 1)

3　讨论

本研究利用 14 条 ISSR 引物从多叶重楼的 8 个居群共 208 份样品中分析得到 251 条条带，其中多态带 235 条，多态位点百分率（PPB）为 93.63%，这个结果与张金渝等（2004）利用 RAPD 对多叶重楼检测到的多态位点百分率（92.05%）相当，这进一步证实了多叶重楼确实具有很高的遗传多样性。本研究结果也同样表现出了多叶重楼种下不同变种间遗传多样性水平的差异，即长药隔重楼（LDP）的遗传多样性水平最低，多态位点百分率（PPB）仅为 29.48%，Nei′s 基因多样性（H_E）为 0.0939，Shannon′s 基因多样性（H_O）为 0.1424；狭叶重楼（QJ）次之，滇重楼的各居群遗传多样性水平皆较高。

在滇重楼的 6 个居群中，又以 DZ4 居群的遗传多样性水平最高（PPB = 60.56%，H_E = 0.1668，H_O = 0.2609），而 HL 居群最低（PPB = 46.61%，H_E = 0.139，H_O = 0.2145），其余 4 个居群的遗传多样性水平介于这两者之间，这可能与其所处的地理位置有一定的关系。DZ4 居群是从云南西北部大理引种到滇中进行种植的；而 HL 居群是取自四川会理的野生居群，该地处于云南高原的边缘，与其它居群相比，该居群规模更小、个体零星分布，居群个体之间可能已经存在自交。此外，有研究发现，滇重楼不同居群间的核型有不同程度的变异，例如，分布在云南的彝良、寻甸和罗平的 3 个不同居群就出现了 3 种不同的染色体结构式（李恒，1998）。不同的居群由于其不同的生境条件，可能受到各种环境因子的影响以及种内自然杂交后染色体在重组时发生了一些结构上的变异，而导致核型结构的变异形成多种细胞型，这也是遗传多样性的表现。

植物居群的遗传结构和遗传多样性受其进化历史和自然环境条件等众多因素的影响，如繁育系统、种子的散布、地理范围以及自然选择等，其中繁育系统是主要的（Hamrick and Godt，1990），并且远交物种要比近交或克隆的物种具有更高的遗传多样性（Xie 等，2005）。多叶重楼植物是虫媒花（李恒，1998），为远交物种（Sage 等，2001），因而具有较高的遗传多样性水平。一般认为，狭域分布的物种往往遗传多样性较低。多叶重楼广泛分布于我国多个省区，尤以西南各省区为多，并且占据多种生境，表现出了较高的遗传多样性，这与我们的分析结果相吻合。

在对居群进行遗传变异分析方面，POPGENE 的分析结果显示居群间遗传分化系数（G_{ST}）为 0.3625，而根据遗传多样性水平在物种水平的基因多样性（H_{sp}）和居群水平的基因多样性（H_{pop}）的分化，各居群间的分化系数（$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$）= 0.3788，WINAMOVA 1.55 软件分析的结果显示，居群间的遗传变异占 41.43%（$P < 0.0002$）。所使用 3 种方法对居群遗传变异分析的

结果虽然有所差异，但均表明多叶重楼各居群间有较高的遗传分化，遗传变异主要存在于居群内。因为多叶重楼植物具有重要药用价值，一直倍受人们的关注。为了满足市场需求，长期的掠夺式采挖已使其目前的生境严重片段化和异质化，野外已经很难找到个体数量较大的居群和幼苗植株。而生境片段化所带来的遗传漂变以及地理隔离造成生态地理环境的差异，可能是多叶重楼各居群间出现较高遗传分化的主要原因之一（Frankham，1995；Souframanien and Gopalakrishna，2004)。

聚类分析的结果显示（图2)，所研究的各居群内个体各自聚在一起，这也是居群间存在一定程度分化的反映。滇重楼6个居群聚为一大支，其中引种栽培居群（DZ4）和3个野生居群（LP，GD和HL）聚为一支；两个引种栽培居群（DX和DZ2）聚为一支，可以看出引种栽培居群和野生居群之间的分化不是很明显。遗传距离分析显示，狭叶重楼和滇重楼的遗传距离在0.0970到0.1344之间，长药隔重楼与滇重楼居群间的遗传距离较远，在0.1882到0.2209之间。故而在UPGMA聚类分析中，滇重楼各居群先与狭叶重楼聚为一支，表明其与狭叶重楼有较近的亲缘关系，而与长药隔重楼的遗传分化较大。

基于我们的实验分析结果，可以看出多叶重楼具有较高的遗传多样性，而人为因素应该是直接导致其目前植物居群和个体减少并成星散分布的主要原因之一。为了合理地利用这些珍贵的中药资源，采取适当而有效的保护措施已势在必行。在保护植物多样性的过程中，栖息地的保护被认为是最重要的，然而由于这些植物生长区域比较广泛、多样，其居群内遗传变异也较高，因此，我们建议可以从个体数量较多的居群中选择植株进行迁地保护。

致谢 感谢本研究组张舒、李洪涛在野外和实验室工作中给予的大力帮助。

〔参 考 文 献〕

李恒等，1998．重楼属植物［M］．北京：科学出版社

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al*. 1995. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Indianapolis: John Wiley & Sons, Inc

Doyle JJ, 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt GM, Johnston A (eds.) Molecular Techniques in Taxonomy [M]. Berlin: Springer-Verlag, 283—293

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA hapltypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, **131**: 479—491

Frankham R, 1995. Conservation genetics [J]. *Ann Rev Genet*, **29**: 305—327

Hamrick JL, Godt MJW, 1990. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL *et al*. (eds.): Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [M]. Sunderland, MA: Sinauer, Associate, Inc., 43—63

Lewontin RC, 1972. Apportionment of human diversity [J]. *Evol Biol*, **6**: 381—398

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**: 3321—3323

Nei M, Li WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5269—5273

Rohlf FJ, 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [DB/CD]. Version 2.1, USA, New York, Setauket, Exeter Software

Sage T, Griffin SR, Pontieri V *et al*. 2001. Stigmatic self-incompatibility and mating patterns in *Trillium grandiflorum* and *Trillium erectum* (Melanthiaceae) [J]. *Ann Bot*, **88**: 829—841

Slatkin M, Borton NH, 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow [J]. *Evolution*, **85**: 733—752

Souframanien J, Gopalakrishna T, 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, **109**: 1687—1693

Tang RH (**唐荣华**), Wang L (**王丽**), Tang XW (**唐小为**) *et al*. 2003. Genetic diversity analysis of Paris by RAPD markers [J]. *J Sichuan Univ* (Nat Sci Ed) (**四川大学学报**), **40** (4): 778—782

Xie GW, Wang DL, Yuan YM *et al*. 2005. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (Celastraceae), an endangered endemic species of eastern China [J]. *Ann Bot*, **95**: 773—777

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ *et al*. 1997. POPGENE, the user-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [Z]. Canada, Edmonton, University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Centre

Zhang JY (**张金渝**), Yu H (**虞泓**), Zhang SG (**张时刚**) *et al*. 2004. RAPD variation within and among four populations of *Paris polyphylla* [J]. *Biodivers Sci*, **12**: 517—522